



Instituto de Fisiología Vegetal
(INFIVE) UNLP-CONICET

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
Universidad Nacional de La Plata

TRABAJO FINAL DE CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

SÍNTESIS Y EFECTOS DEL ÓXIDO NÍTRICO EN PLANTAS DE SOJA CRECIENDO EN CONDICIONES LIMITANTES DE FÓSFORO

Estudiante: Ignacio Alejandro Delgado.

Legajo: 26467/4.

DNI: 35412136

Correo electrónico: ignaciodelgado91@hotmail.com.ar

Teléfono: 02262-15630733.

Fecha de entrega: 08/09/2016.

Director: Marcela Simontacchi.

Co-Director: Facundo Ramos Arturo.

Resumen

La disponibilidad de fósforo (P) para los cultivos es una problemática que afecta los suelos a nivel mundial. La baja disponibilidad de P para ser utilizado por las plantas, conlleva a la necesidad del uso de fertilizantes en grandes cantidades, los que por fenómenos de escorrentía suelen terminar contaminando cursos de agua. Por otra parte la disponibilidad de roca madre para la obtención del P utilizado como fertilizante constituye un recurso finito (Cordell y col., 2009), estos aspectos hacen que resulte de interés plantear como estrategia el estudio de los factores que puedan optimizar la eficiencia de absorción y uso de P por las plantas.

El óxido nítrico (NO) es una molécula bioactiva sintetizada por las plantas que participa en numerosos procesos fisiológicos y de estrés.

En este trabajo se estudió el efecto de un dador de NO (S-nitrosoglutatión) sobre plantas que crecieron en condiciones de restricción total de P. La presencia de NO no afectó significativamente los parámetros de crecimiento, del mismo modo no modificó la concentración de P en raíz ni en las primeras hojas (hojas más viejas), comparado con las plantas que crecieron en ausencia del dador de NO. Sin embargo se observó que el NO retrasó la senescencia inducida por la deficiencia de P en las hojas más viejas.

INDICE

	Pág.
Introducción	4
Hipótesis	7
Objetivo general y objetivos particulares	7
Materiales y métodos	8
Material vegetal y tratamientos	8
Peso fresco	9
Contenido total de fósforo en los tejidos	9
Removilización de P	9
Determinación de la concentración de NO	10
Evaluación de tasa fotosintética	10
Contenido de pigmentos fotosintéticos	
Conductancia estomática	11
Análisis estadístico	11
Resultados	12
Discusión	24
Conclusión	27
Bibliografía	28

Título: SÍNTESIS Y EFECTOS DEL ÓXIDO NÍTRICO EN PLANTAS DE SOJA CRECIENDO EN CONDICIONES LIMITANTES DE FÓSFORO

Área: Fisiología Vegetal.

Modalidad: Trabajo de Investigación

Introducción

En los últimos años se reconoció al óxido nítrico (NO) como una molécula con importante participación en numerosos procesos de la fisiología vegetal, que van desde la germinación hasta la senescencia (Lamattina y col., 2003; Simontacchi y col., 2015). El NO es sintetizado por las plantas por mecanismos que aún no están totalmente dilucidados, mientras que los niveles de esta molécula en los tejidos actúan como reguladores del crecimiento y median la acción de las hormonas vegetales (Simontacchi y col., 2013; Gupta y col., 2011).

Trabajos recientes ponen en evidencia el papel del NO frente a situaciones de cambio en la disponibilidad de nutrientes minerales esenciales, principalmente deficiencia de hierro (Graziano y Lamattina, 2007).

La evidencia de la participación del NO en las respuestas de las plantas a bajo suministro de fósforo (-P) se obtuvo en lupino blanco (*Lupinus albus*), donde la deficiencia de P provoca la ramificación de raíces y liberación de sustancias de bajo peso molecular como ácidos orgánicos y protones (Lambers y col., 2011; Niu y col., 2013). Se demostró que dos respuestas de aclimatación a la restricción de P en lupino blanco, cambios en la morfología de la raíz (generación de raíces proteoides) y la exudación de citrato, ocurren en coincidencia con elevados niveles de NO en las raíces (Wang y col., 2010). Además, la adición de donadores de NO como nitroprusiato de sodio (SNP) y S-nitrosoglutatión (GSNO) también condujo a la formación de raíces proteoides (raíces altamente ramificadas que determinadas especies forman cuando se enfrentan a situaciones limitantes de P) en esta especie (Meng y col., 2012).

Se han descrito funciones para el NO asociadas a la interacción de las plantas con numerosos nutrientes. En cuanto al potasio, se observó que la suplementación de NO exógeno aumenta el contenido de K⁺ bajo condiciones de exposición a altas concentraciones de sal en la planta halófila *Kandelia obovata*, y que este aumento se

correlaciona con cambios en el transporte de iones (un aumento de los transcritos del canal para el transporte de potasio, AKT1) (Chen y col., 2013). El NO participa en el control de la homeostasis de metales de transición, en particular hierro, ya que se observó que la exposición a NO revierte los síntomas de clorosis en plantas expuestas a deficiencia de hierro y además afecta los mecanismo de absorción del mismo (Graziano y col., 2002; Graziano y Lamattina 2007). Se demostró además que tiene un papel en la modulación de la captura de Zn, en plantas expuestas a cantidades excesivas de este elemento (Xu y col., 2010), así como bajo condiciones de restricción de Zn (Buet y col., 2014). La adición del dador GSNO como una fuente de NO en plantas de trigo privadas de Zn, provocó aparición acelerada de síntomas de senescencia en hojas que fue acompañado por una disminución de la asignación de Zn a brotes (Buet y col., 2014).

Existe información referida a que el NO participa en respuestas de las plantas a cambios en las condiciones ambientales, como por ejemplo cierre de estomas (Neill y col., 2002), desarrollo de raíces laterales (Pagnussat y col., 2002) y síntesis de antocianinas (Hao y col., 2009; Zhang y col., 2011).

Las auxinas son fitohormonas que a concentraciones extremadamente bajas (10^{-7} a 10^{-13} M dependiendo la especie y la edad de las plantas) estimulan la elongación de raíces y ramificación de raíces laterales. Se demostró que la organogénesis es promovida por el NO mediando las respuestas a auxinas en *Cucumis sativus* (Pagnussat y col., 2002) y en *Solanum lycopersicum* (Correa - Aragunde y col., 2004). El efecto estimulante del NO en la elongación de la raíz se observó en maíz (Gouvea 1997). Dos dadores de NO, SNP y S-nitroso,N-acetilpenicilamina (SNAP), aplicados en el hipocotilo (raíces primarias eliminadas) del pepino (*Cucumis sativus*) fueron capaces de imitar el efecto de la auxina IAA en la inducción de la formación de raíces adventicias (Pagnussat y col., 2002).

En plantas de tomate sometidas a deficiencia de hierro, se observó una profusa ramificación de raíces que fue acompañada por un aumento de los niveles endógenos de auxinas y NO. (Pagnussat y col., 2002; Jin y col., 2011). En este modelo experimental se obtuvo evidencia de que la síntesis de NO actúa corriente abajo de la acción de las auxinas. (Terrile y col. 2012).

La senescencia en las especies monocárpicas tiene gran importancia en la removilización de nutrientes desde las hojas hacia los granos, y es influenciada tanto por factores externos como internos. Entre los factores que pueden acelerar la

senescencia se encuentran las deficiencias nutricionales. Durante la senescencia se degradan las clorofilas, disminuye la capacidad para realizar fotosíntesis y se degradan las proteínas y ácidos nucleicos. La degradación de ácidos nucleicos, principalmente el ARN ribosómico, constituye una fuente importante de C, N y P (Bariola y col., 1994).

Es conocido, desde hace ya más de 150 años, que el fósforo (P) es un nutriente esencial requerido para el crecimiento y normal desarrollo de las plantas, donde forma parte de moléculas tales como ADN, ARN y fosfolípidos de membranas. Por otro lado, participa en numerosas reacciones de intercambio, actuando como transductor de energía química, así como en procesos de señalización celular (Epstein y Bloom, 2005). La disponibilidad de HPO_4^{2-} en la solución del suelo que baña las raíces suele ser baja por lo que se estima que entre el 40 y el 60 % del rendimiento de los cultivos se encuentra condicionado por este nutriente (Uexküll y Mutert, 1995).

Han sido observadas diversas respuestas fisiológicas a la baja disponibilidad externa de P, algunas de las cuales varían en gran medida entre especies. Así, mientras que el bajo suministro de P conduce a una reducción de la elongación de las raíces en *Arabidopsis* y otras plantas (Jiang y col., 2007), en trigo se ha observado un incremento del peso seco de la raíz (Wang y col., 2013). En ambos grupos de plantas existe una clara tendencia a la acumulación diferencial de biomasa en la raíz, con respecto al vástago, así como a la proliferación de raíces laterales (Jiang y col., 2007). Por otro lado, se ha observado que cuando las raíces, acorde a su crecimiento exploratorio, encuentran zonas de abundante disponibilidad de P, ocurre un crecimiento localizado (Chiou y Lin, 2011). En tanto, diferencias en la utilización de P podrían estar reflejando diferencias, entre distintas especies o variedades, en la removilización de este nutriente desde las hojas viejas hacia las jóvenes, la recuperación de P desde el ARN debido a la actividad de ribonucleasas o cambios en el patrón de senescencia (Bariola y col. 1999).

Dado que el NO ha sido descrito como un factor antisenescente (Jasid y col., 2009), se plantea el análisis del progreso de la senescencia en hojas de soja inducida por la deficiencia de fosfato en relación a la disponibilidad de óxido nítrico.

Teniendo en cuenta que la deficiencia de nutrientes es un factor que actúa induciendo la senescencia de hojas, en el presente proyecto se evaluó el efecto del NO agregado en forma exógena sobre los indicadores de senescencia en plantas con

bajo contenido de P. Dado que el proceso de senescencia es acompañado por la redistribución de nutrientes que poseen movilidad dentro de la planta, como es el caso del P, se analizó la distribución entre distintos órganos y si esta redistribución es afectada por la presencia de NO. El flujo transpiratorio es un factor a tener en cuenta en relación a la incorporación de nutrientes minerales mediante flujo masal, por lo que la conductancia estomática se evaluó en relación a la aplicación de NO.

Hipótesis

- El óxido nítrico actúa como mediador en respuestas a bajas concentraciones de nutrientes minerales y presenta niveles endógenos diferenciales en plantas control y expuestas a deficiencia de fosfato.
- La adición de un dador de óxido nítrico a plantas de soja retrasa la senescencia y la removilización de nutrientes.

Objetivo general

El objetivo central de este plan de trabajo es evaluar la síntesis endógena de óxido nítrico (NO) en plantas de soja creciendo en condiciones adecuadas y limitadas en el suministro de P (como fosfato). Se evaluó además el efecto del NO agregado en forma exógena sobre la senescencia foliar y distribución de fósforo total en la planta.

Objetivos particulares

- 1- Analizar el contenido endógeno de NO en plantas de soja creciendo en condiciones adecuadas de suministro de nutrientes y bajo restricción de P.**
- 2- Analizar el efecto del NO sobre la senescencia en hojas de plantas de soja creciendo en condiciones de restricción de P.**
- 3- Analizar el efecto del NO sobre la distribución de P en plantas de soja creciendo en condiciones de restricción de P.**

Materiales y Métodos

Material vegetal y tratamientos

Semillas de soja (*Glycine max*, cv DM4800) se esterilizaron mediante lavado con solución de hipoclorito de sodio 10% durante 5 minutos, y se germinaron en oscuridad durante 48 h a 28°C. Posteriormente se transfirieron a recipientes plásticos de 0,8 L de capacidad, conteniendo solución nutritiva con la siguiente composición: Ca(NO₃)₂ 1 mM, MgSO₄ 0,5 mM, NaCl 0,15 mM, KCl 1mM, FeEDTA 50 μM, CaCl₂ 50 μM, H₃BO₃ 25 μM, ZnSO₄ 2 μM, MnSO₄ 2 μM, CuSO₄ 0.5 μM, ácido molíbdico (MoO₃.3H₂O) 0,5 μM, MES 2,5 mM, y H₃PO₄ 0,5 mM. El pH se ajustó a 6,0 mediante la adición de Ca(OH)₂. Las soluciones fueron aireadas continuamente, se renovaron día por medio y la densidad de plantas fue de una por recipiente. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo ubicada en el INFIVE. La temperatura fue de 24±2°C y el fotoperíodo de 14 h, la radiación fotosintéticamente activa fue de 300 μmoles fotones s⁻¹ provista por un banco de luces fluorescentes Philips de 40W.

Luego de 1 semana (tiempo 0 del experimento) las plantas se dividieron en forma aleatoria en grupos que recibieron los siguientes tratamientos:

- 1- Solución nutritiva completa (+P, grupo control),
- 2- Solución nutritiva sin el agregado de P (-P). En el caso de las soluciones sin el agregado de ácido fosfórico se compensó la cantidad de Ca²⁺ requerida para llevar el pH a 6,0 mediante el agregado de CaCl₂,
- 3- Agregado del dador de NO (S-nitrosoglutatión;GSNO) en la solución nutritiva carente de P, en dos concentraciones diferentes (50 μM y 100 μM).

La solución madre de GSNO 70 mM fue sintetizada químicamente a partir de la mezcla de volúmenes iguales de glutatión (GSH) 140 mM, preparado en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7,4, y NaNO₂140 mM, preparado en HCl 0,1 N. Las soluciones de trabajo fueron preparadas a partir de la solución madre descrita más arriba. El dador de NO se agregó con cada cambio de solución nutritiva (3 veces por semana). Se realizó un muestreo inicial (todas plantas control) para evaluar parámetros iniciales. Los tratamientos se mantuvieron durante tres semanas, al finalizar los mismos las plantas tuvieron 4 semanas en total de crecimiento y fueron cosechadas.

Peso fresco

Las determinaciones se realizaron en el momento de iniciar el tratamiento (1 semana) y al finalizar el mismo (4 semanas).

El peso fresco se determinó pesando el material vegetal inmediatamente después de ser cosechado. A partir de estas mediciones se evaluó la acumulación de materia en raíz y parte aérea y la partición (relación vástago:raíz).

Contenido total de fósforo en los tejidos

Las determinaciones se realizaron en hojas individuales (hojas unifoliadas y primera hoja trifoliada) y en raíz en el momento de iniciar el tratamiento (1 semana) y al finalizar el mismo (4 semanas). Las muestras obtenidas para la determinación del peso seco se incineraron a temperatura de 450°C en mufla hasta obtención de cenizas blancas (aprox. 3 h). Se procedió al agregado de solución de ácido nítrico diluido 1:7 en agua destilada. Posteriormente se determinó el contenido de P en el digesto según la técnica de fosfo-molibdo-vanadato descrita por Kitson y Mellon (1944).

Se utilizaron dos soluciones.

Solución A: Se disuelven 1,25 g de NH_4VO_3 en agua hirviendo. Una vez enfriado a temperatura ambiente se adicionan 10 ml de HNO_3 y se lleva a volumen final de 500 ml con H_2O destilada.

Solución B: Consiste en una solución de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ al 5% en H_2O destilada.

Curva de calibración: Se prepararon las distintas soluciones de fosfato que conforman la curva de referencia (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 ppm). Se adicionaron 3,5 ml de HNO_3 al 50% y el volumen necesario de KH_2PO_4 (100 ppm) para obtener cada una de las concentraciones. Finalmente se llevó cada preparación a un volumen de 50 ml mediante el agregado de H_2O destilada.

Procedimiento: Se adicionaron los reactivos: 250 μl de muestra, 100 μl de la solución A, 100 μl de la solución B y finalmente 550 μl de H_2O bidestilada. La medición de la absorbancia de las muestras se realizó con un espectrofotómetro a $\lambda = 460$ nm y las concentraciones se calcularon mediante contraste contra la curva patrón realizada con soluciones de concentración conocida de P.

Removilización de P

La eficiencia porcentual de removilización de P se obtuvo a partir del siguiente cálculo:

$$\% \text{ eficiencia} = \frac{(\text{P total en hojas maduras} - \text{P total en hojas senescentes})}{\text{P total en hojas maduras}} \times 100$$

Determinación de los niveles de NO

Las determinaciones de niveles de NO en tejidos se realizaron en muestras frescas, inmediatamente después de ser cosechadas, con el fin de comparar los niveles endógenos en plantas control y bajo restricción de P.

Se realizaron estudios de microscopía de fluorescencia en la raíz, a fin de evaluar *in vivo* el efecto de la deficiencia de P sobre la generación de NO. Los cortes de tejidos fueron incubados durante 30 min en presencia del fluoróforo DAF-FM DA (Galatro y col., 2013) y luego de enjuagarlos por 15 min se analizaron al microscopio óptico de fluorescencia (Olympus, modelo BX51).

Indicadores de senescencia:

- *Rendimiento cuántico efectivo PSII.*

Se evaluó a través de la medición de la fluorescencia de clorofila de las hojas con un equipo de fluorescencia modulada, utilizando el método del pulso saturante (FMS2, Hansatech Instruments, UK). En presencia de iluminación constante (irradiancia a la cual crecieron las plantas, $300 \mu\text{moles fotones s}^{-1}$), el rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II (Φ_{PSII}) se obtuvo directamente a partir de la lectura del equipo mencionado según $\Phi_{\text{PSII}} = (F'm - F't) / F'm$ (Maxvell and Johnson, 2000).

- *Contenido de pigmentos fotosintéticos*

Para la cuantificación de pigmentos las hojas fueron trituradas en mortero utilizando N_{liq} , el polvo obtenido se pesó (50 a 100 mg) y se realizó la extracción empleando acetona al 80% e incubando durante 4h a 4°C en oscuridad. Posteriormente, para separar los restos de tejido de la solución con los pigmentos, se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a 8000 rpm. El contenido de clorofila *a*, clorofila *b* y de carotenos totales en la fase orgánica fue determinado espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de las muestras a $\lambda=663 \text{ nm}$, $\lambda=647 \text{ nm}$ y $\lambda=470 \text{ nm}$ (Lichtenthaler, 1987). El contenido de clorofila se expresó en base al peso fresco.

mg/ ml de clorofila a = $12,25 \text{ Abs}_{663 \text{ nm}} - 2,79 \cdot \text{Abs}_{647 \text{ nm}}$.

mg/ ml de clorofila b = $21,50 \text{ Abs}_{647 \text{ nm}} - 5,1 \cdot \text{Abs}_{663 \text{ nm}}$.

mg/ ml de a + b (clorofila total) = $7,15 \text{ Abs}_{663 \text{ nm}} + 18,71 \text{ Abs}_{647 \text{ nm}}$.

mg/ ml de carotenos = $(1000 \cdot \text{Abs}_{470 \text{ nm}} - 1,82 \text{ mg a /ml} - 85,0 \text{ mg b/ml}) / 198$.

Conductancia estomática

Como fue mencionado antes, el NO participaría de la vía de transducción de señales en el mecanismo de cierre estomático. La conductancia estomática se evaluó en la cara abaxial de las hojas utilizando un porómetro Leaf porometer Model sc-1, (Decagon), luego de tres horas de comenzado el fotoperíodo.

Análisis estadístico

Se realizaron tres experimentos independientes con un número de muestras de 4 para cada grupo (total de 16 macetas por experimento).

En todos los casos el análisis estadístico de los datos se efectuó a través de ANOVA de una vía (one way ANOVA), las comparaciones post-hoc se hicieron a través del test de Tukey.

Resultados:

Las plantas control al momento de la cosecha presentan en promedio 7 hojas trifoliadas y tres ramificaciones axilares. Las plantas expuestas a deficiencia de P contaban en promedio con 4,5 hojas trifoliadas independientemente de haber sido expuestas o no al dador de NO. Las plantas deficientes en P presentan una drástica reducción en el número de ramificaciones axilares, encontrándose solo una ramificación o ausencia de las mismas.

Con el objetivo de conocer el crecimiento de las plantas en cada tratamiento, se determinó el peso fresco del vástago de todas las plantas cultivadas. Al finalizar las cuatro semanas de crecimiento en los tratamientos bajo restricción de P se observó una disminución estadísticamente significativa con respecto al tratamiento control (Fig.1).

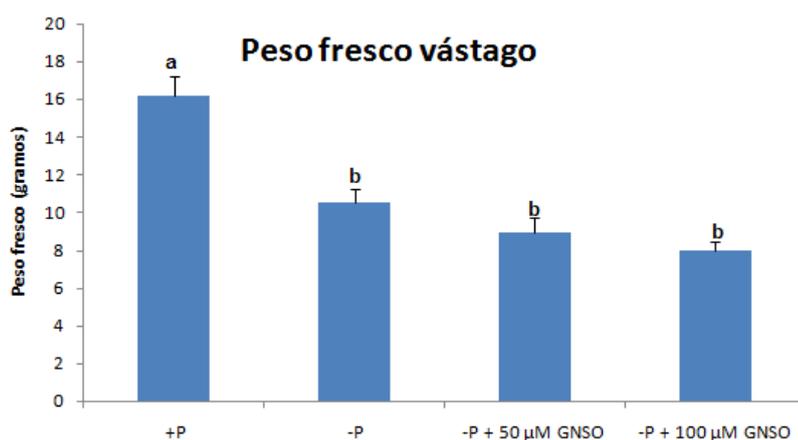


Figura n°1. Peso fresco del vástago en plantas de soja (*Glycine max*) de 4 semanas de crecimiento.

Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa (+P) y sin el agregado de P (-P) y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 μ M (-P + 50 μ M GNSO) y 100 μ M (-P + 100 μ M GNSO). El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey ($P < 0,05$).

En cambio, cuando se determinó el peso fresco de las raíces, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un peso para el control de 8 ± 1 g de raíz/planta (Fig. 2).

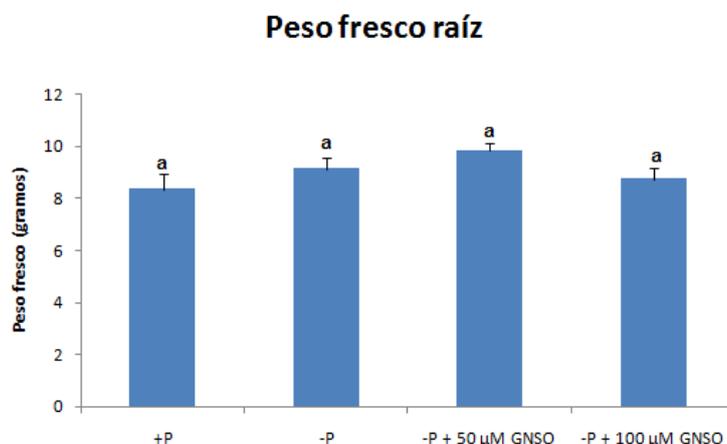


Figura n°2. Peso fresco de la raíz en plantas de soja (*Glycine max*) de 4 semanas de crecimiento.

Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa (+P) y sin el agregado de P (-P) y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 µM (-P + 50 µM GNSO) y 100 µM (-P + 100 µM GNSO). El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey ($P < 0,05$).

Para evaluar la distribución de recursos, se calculó la relación vástago:raíz. Este parámetro es considerado como uno de los primeros afectados en el curso de la deficiencia de varios nutrientes (Perét y col, 2011). En las plantas sometidas a deficiencia de P se observó una menor relación vástago:raíz. (Fig. 3).

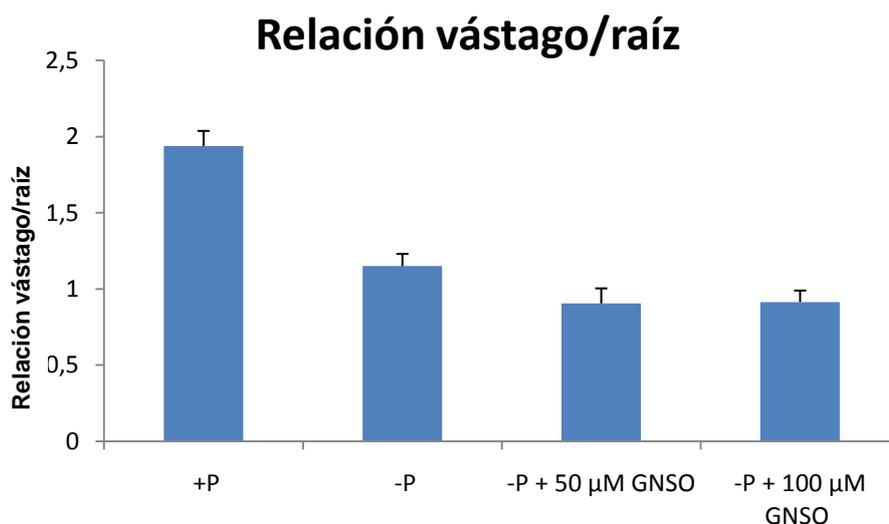


Figura n°3. Relación vástago/raíz en plantas de soja (*Glycine max*) de 4 semanas de crecimiento

Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa (+P) y sin el agregado de P (-P) y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 μM (-P + 50 μM GNSO) y 100 μM (-P + 100 μM GNSO). El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey ($P < 0,05$).

En los grupos con deficiencia de P, no se observaron diferencias significativas de peso fresco del vástago, peso fresco de la raíz y relación vástago:raíz como consecuencia del agregado del dador de NO.

A las cuatro semanas se analizó el contenido de fósforo en los tejidos de las plantas. Como se puede observar en la tabla n° 1, las plantas de soja cultivadas en solución completa tienen una concentración de fósforo superior al resto de los tratamientos, con valores $32 \pm 2 \mu\text{mol/g PF}$ en raíz y $17 \pm 1 \mu\text{mol/g PF}$ en vástago, mientras que un análisis más detallado muestra una concentración de P de $114 \pm 9 \mu\text{mol/g PF}$ en la hoja 1 (primer par de hojas unifoliadas) y de $91 \pm 9 \mu\text{mol/g PF}$ en la primera hoja trifoliada. Esta diferencia del grupo control, con respecto a las de privadas de P se debe a las diferencias en el suministro de fósforo durante todo el experimento. Los tratamientos con restricción de P no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre sí explicadas por el agregado de GSNO.

Tabla n°1:

Tratamiento	[P] en raíz	[P] en vástago	[P] en H1	[P] en trifoliada
	($\mu\text{mol/g PF}$)			
Control	$32,5 \pm 2^a$	$17,0 \pm 0,8^a$	$114 \pm 9 a$	$91 \pm 9 a$
-P	$2,1 \pm 0,5^b$	$0,31 \pm 0,04^b$	$2,6 \pm 0,9 b$	$4,3 \pm 0,2 b$
- P + 50 μM GNSO	$2,3 \pm 0,5^b$	$0,36 \pm 0,04^b$	$4 \pm 1 b$	$5 \pm 1b$
- P + 100 μM GNSO	$2,1 \pm 0,4^b$	$0,44 \pm 0,04^b$	$4 \pm 1 b$	$5 \pm 1 b$

Tabla nº 1: Concentración de fósforo en raíz, vástago, primera hoja unifoliada y primera hoja trifoliada, en plantas de soja (*Glycine max*) de 4 semanas de crecimiento. Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa (+P) y sin el agregado de P (-P) y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 μM (-P + 50 μM GNSO) y 100 μM (-P + 100 μM GNSO). El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media y \pm ESM. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey ($P < 0,05$).

Se calculó la eficiencia de removilización de fósforo (%), es decir, el porcentaje de fósforo que se removilizó desde las hojas senescentes hacia las hojas maduras. No se observaron diferencias estadísticamente significativas pero hay una tendencia a ser mayor en todos los tratamientos con restricción de fósforo (Fig. 4).

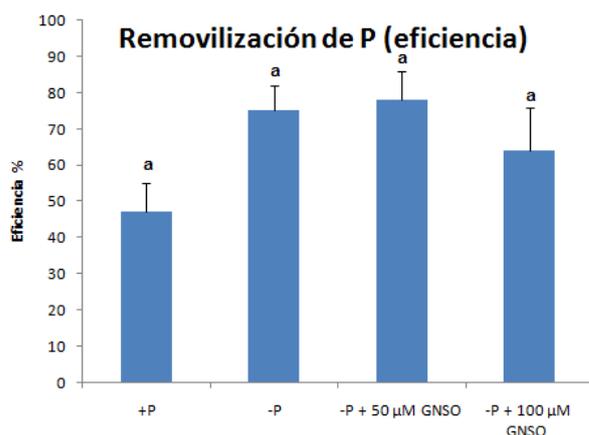
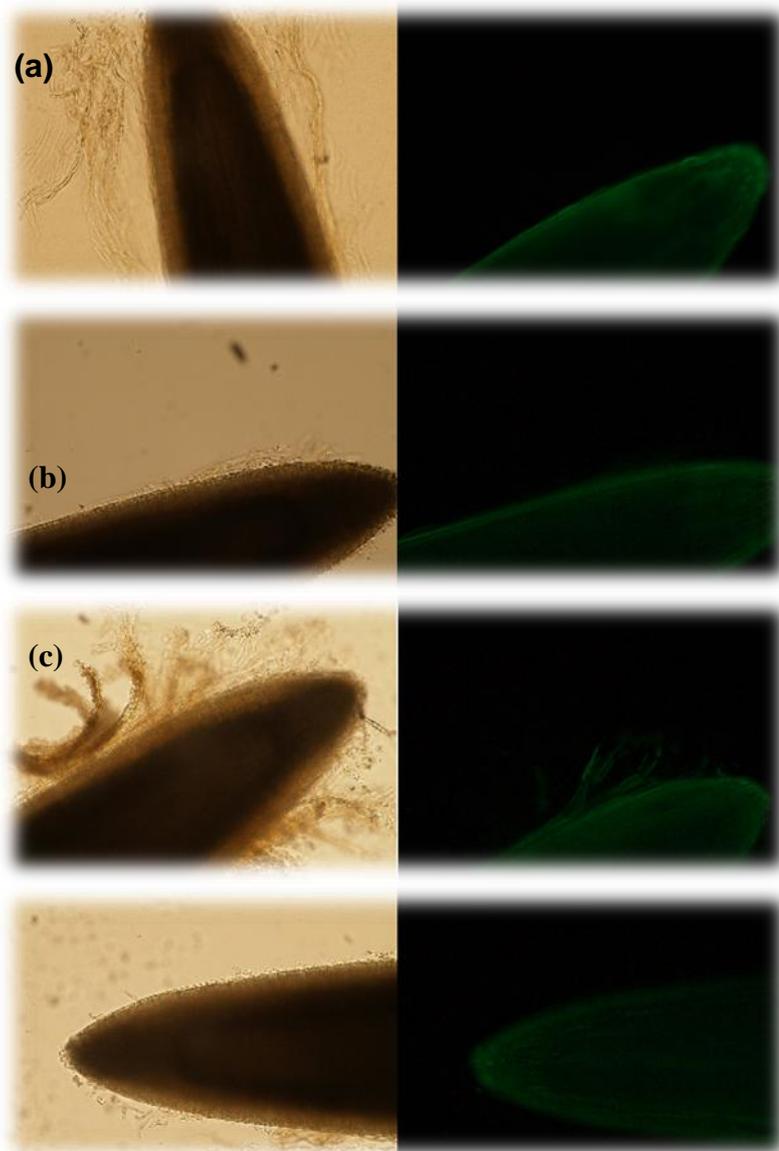


Figura nº4. Removilización de fósforo expresado en eficiencia (%) en plantas de soja (*Glycine max*) de 4 semanas de crecimiento.

Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa (+P) y sin el agregado de P (-P) y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 μM (-P + 50 μM GNSO) y 100 μM (-P + 100 μM GNSO). El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey ($P < 0,05$).

Cuando se analizaron los niveles de NO en el microscopio de fluorescencia no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro tratamientos (Imágenes a, b, c y d).



Imágenes:

(a) Fotografía de la raíz en campo claro (a la izquierda) y con la utilización del microscopio de fluorescencia (a la derecha) en plantas control de soja de cuatro semana de tratamiento.

(b) Fotografía de la raíz en campo claro (a la izquierda) y con la utilización del microscopio de fluorescencia (a la derecha) en plantas de cuatro semana de tratamiento bajo la restricción de fósforo.

(c) Fotografía de la raíz en campo claro (a la izquierda) y con la utilización del microscopio de fluorescencia (a la derecha) en plantas de cuatro semana de tratamiento bajo la restricción de fósforo y la adición de $50 \mu\text{M}$ de *NO exógeno*.

(d) Fotografía de la raíz en campo claro (a la izquierda) y con la utilización del microscopio de fluorescencia (a la derecha) en plantas de cuatro semana de tratamiento bajo la restricción de fósforo y la adición de $100 \mu\text{M}$ de *NO exógeno*.

El corte de tejido se incubo en presencia de un fluoróforo DAF-FM DA específico para la detección de NO.

En cuanto a los indicadores de senescencia se determinó el contenido de pigmentos fotosintéticos. En la hoja 1 se puede observar que se mantuvo el nivel de clorofila total en valores cercanos a los valores control ($15 \pm 2 \text{ mg/ g PF}$) en plantas expuestas a restricción de fósforo simultáneamente con la aplicación de un dador de NO (Fig. 5a), mientras que las plantas con restricción de P presentaron valores significativamente menores.

La clorofila *b* se sintetiza a expensas de la clorofila *a*, y la relación de concentraciones entre ambas clorofilas se puede ver afectada en condiciones de alta luminosidad o de deficiencia de nitrógeno (Kitajima y Hogan, 2003). Para evaluar si los tratamientos ensayados afectan a algún tipo de clorofila en particular, se discriminó entre la clorofila *a* y *b*. En la hoja 1, para los dos tipos de clorofila, los tratamientos en presencia del dador de NO tienen valores cercanos al tratamiento control con un valor de $11 \pm 1 \text{ mg/ g PF}$ y $3,9 \pm 0,1 \text{ mg/ g PF}$ de clorofila *a* y *b*, respectivamente (Figs. 5b y 5c). En el tratamiento con limitación de P y sin la presencia del dador de NO se observa una disminución estadísticamente significativa de la concentración de ambos tipos de clorofila. El contenido de carotenos en la hoja 1 no resultó afectado durante la restricción de fósforo con un valor para el control de $2,6 \pm 0,3 \text{ mg/ g PF}$ (Fig. 5d).

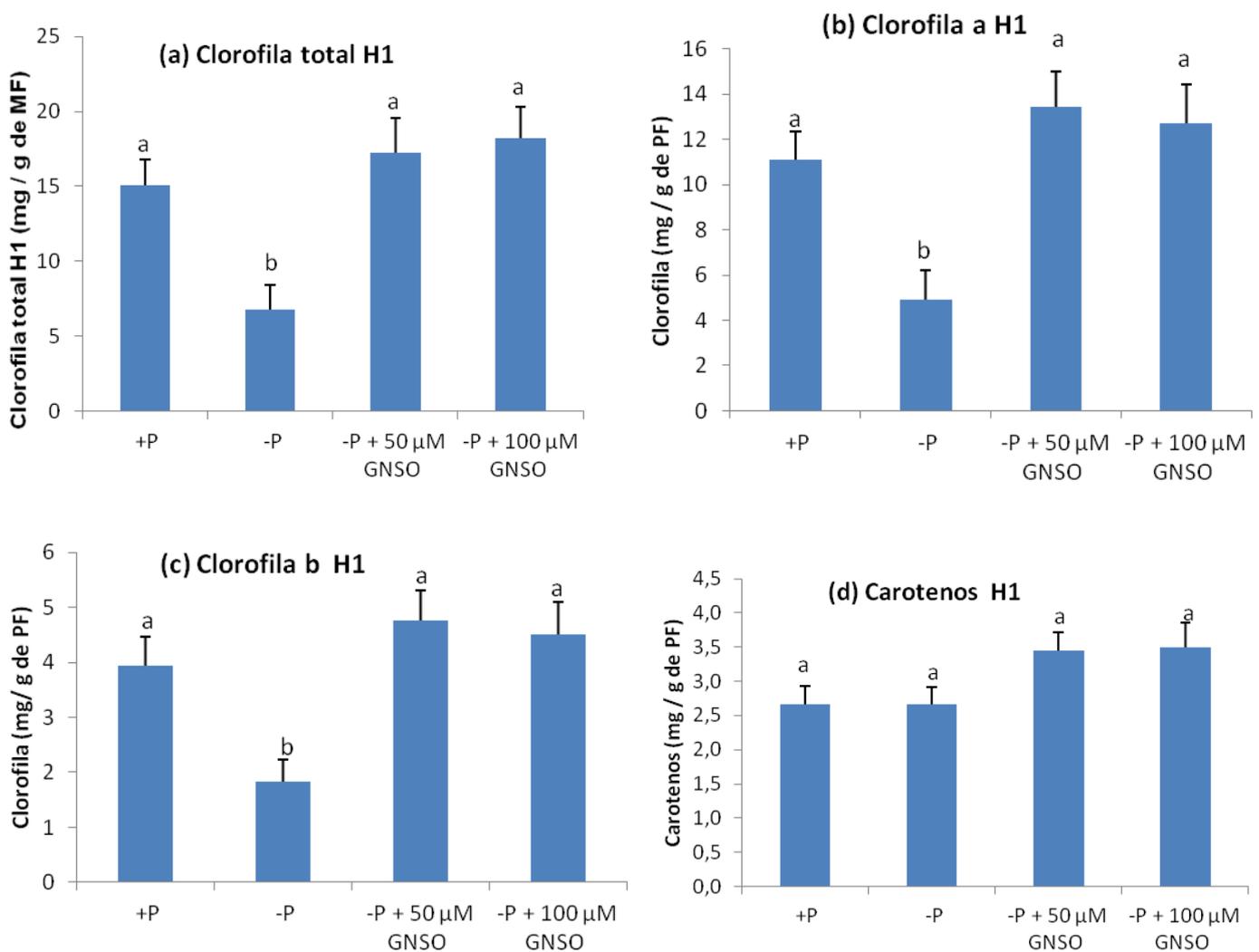


Figura n°5. (a) Clorofila total en la primera hoja unifoliada en plantas de soja (*Glycine max*) de 4 semanas de crecimiento. **(b)** Concentración de clorofila a en la primera hoja unifoliada en plantas de soja de 4 semanas de crecimiento. **(c)** Concentración de clorofila b en la primera hoja unifoliada en plantas de soja de 4 semanas de crecimiento. **(d)** Concentración de carotenos en la primera hoja unifoliada en plantas de soja 4 semanas de crecimiento.

Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa (+P) y sin el agregado de P (-P) y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 μM (-P + 50 μM GNSO) y 100 μM (-P + 100 μM GNSO). El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey ($P < 0,05$).

En la primera de las hojas trifoliadas se observa un aumento significativo de clorofila a, clorofila b y carotenos totales en los tratamientos con restricción de P en presencia del dador de NO comparado con los tratamientos -P sin dador de NO y con las plantas controles (Figs. 6a, 6b, 6c y 6d).

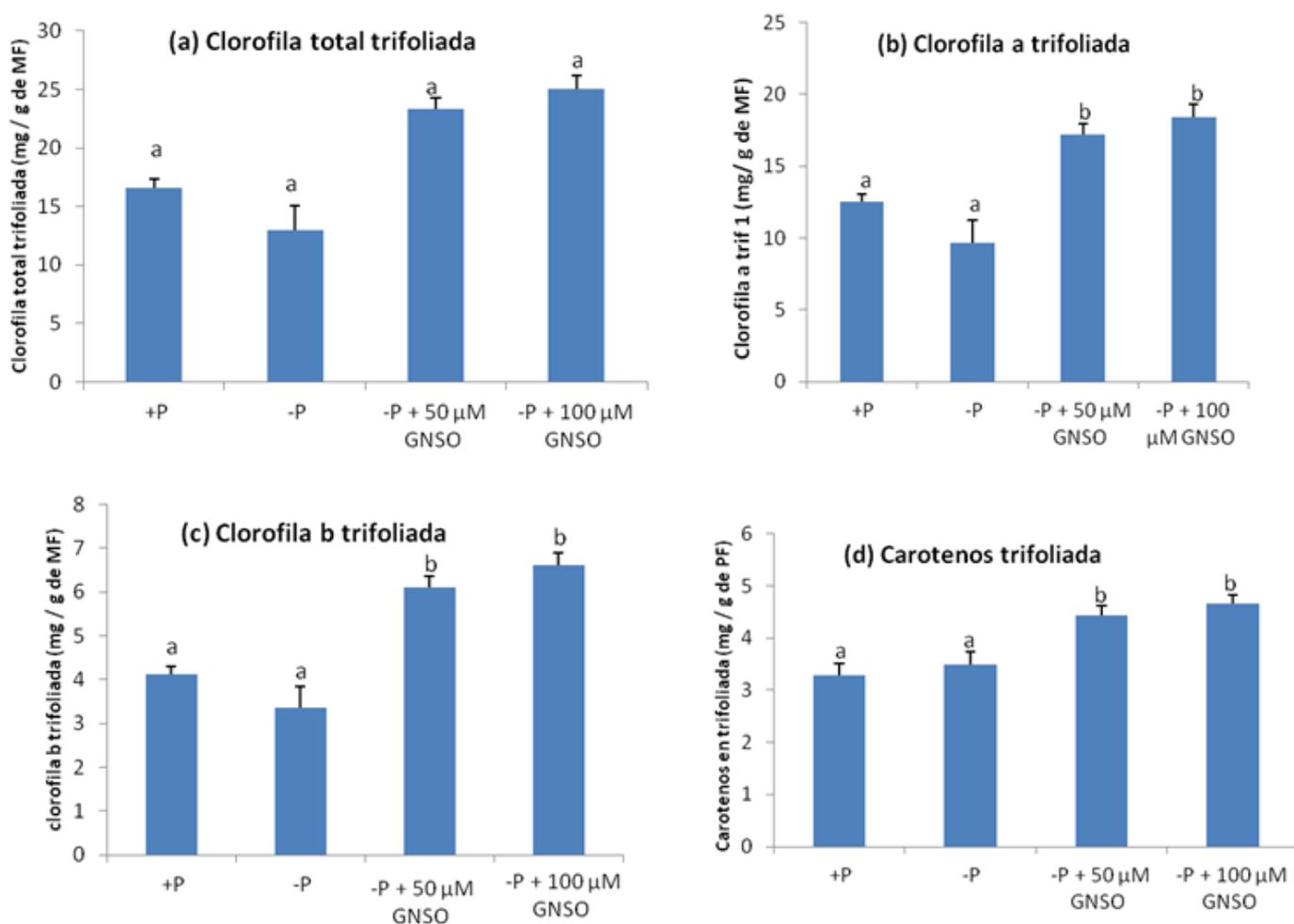


Figura n°6. (a) Concentración de clorofila total en la primera hoja trifoliada en plantas de soja (*Glycine max*) de 4 semanas de crecimiento. (b) Concentración de clorofila a en la primera hoja unifoliada en plantas de soja de 4 semanas de crecimiento. (c) Concentración de la clorofila b en la primera hoja trifoliada en plantas de soja de 4

semanas de crecimiento. **(d)** Concentración de carotenos en la primera hoja trifoliada en plantas de soja de 4 semanas de crecimiento.

Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa (+P) y sin el agregado de P (-P) y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 μM (-P + 50 μM GNSO) y 100 μM (-P + 100 μM GNSO). El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey ($P < 0,05$).

Comparando los dos tratamiento con dador de NO, se observó una tendencia a una mayor concentración de pigmentos fotosintéticos en el tratamiento con 100 μM GNSO.

Con el objetivo de evaluar la integridad del aparato fotosintético, se determinó rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II en la primera hoja unifoliada y en la primera hoja trifoliada.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II en la hoja 1 entre las plantas cultivadas con provisión adecuada y limitada de P (con un valor promedio 0,73 para las plantas control), la exposición a NO de las plantas privadas de P provocó un incremento del rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II con valores similares a las plantas control (Fig.7). En la hoja trifoliada se observaron diferencias significativas entre el tratamiento control (con un valor de 0,71) y los tratamientos con restricción de P (Fig.8).

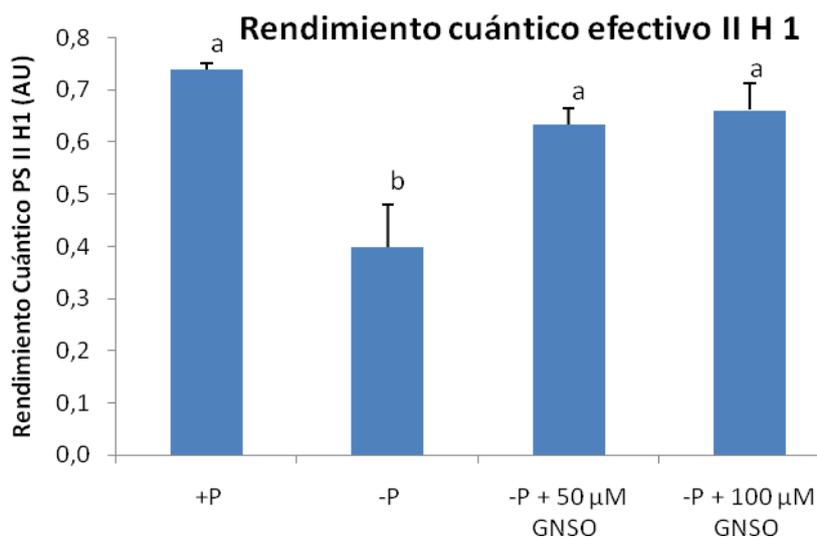


Figura n°7. Rendimiento Cuántico II en la primera hoja unifoliada en plantas de soja (*Glycine max*) de 4 semanas de crecimiento

Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa (+P) y sin el agregado de P (-P) y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 μ M (-P + 50 μ M GNSO) y 100 μ M (-P + 100 μ M GNSO). El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey ($P < 0,05$).

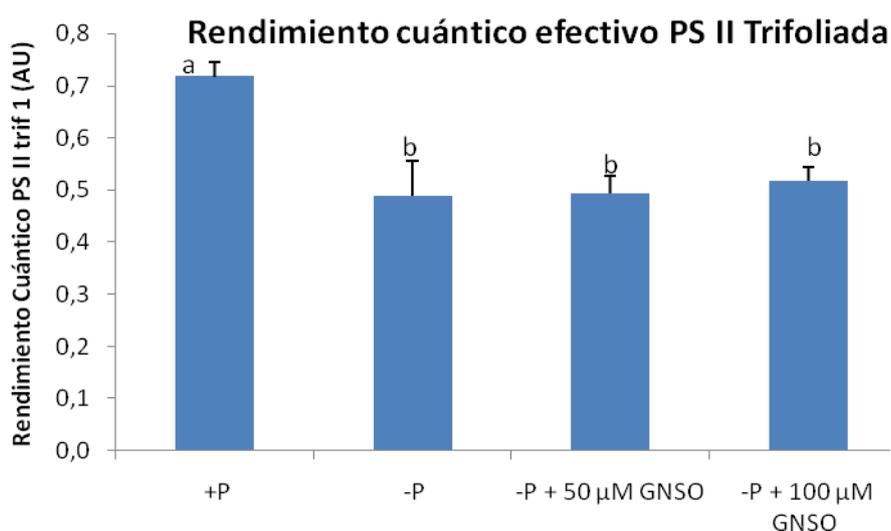


Figura n°8. Rendimiento cuántico II en la primera hoja trifoliada en plantas de soja (*Glycine max*) de 4 semanas de crecimiento

Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa (+P) y sin el agregado de P (-P) y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 μM (-P + 50 μM GNSO) y 100 μM (-P + 100 μM GNSO). El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey ($P < 0,05$).

Se determinó con el porómetro la conductancia estomática en la primera hoja unifoliada y la primera hoja trifoliada. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en las mediciones en la hoja 1 (con un valor promedio 55 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en plantas control) (Fig.9). En cambio, se observaron diferencias en la primera hoja trifoliada entre las plantas con solución completa y las plantas con limitación de fósforo (con un valor promedio de 74 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para las plantas control). La presencia del dador de NO no ejerció efecto sobre la conductancia estomática (Fig. 10).

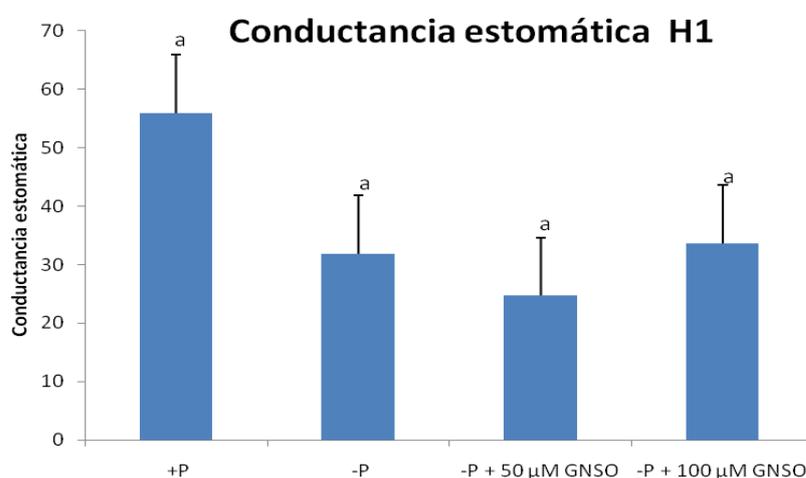


Figura n°9. Tasa de transpiración ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en la primera hoja unifoliada en la cara abaxial en plantas de soja (*Glycine max*) de 4 semanas de crecimiento.

Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa (+P) y sin el agregado de P (-P) y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 μM (-P + 50 μM GNSO) y 100 μM (-P + 100 μM GNSO).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey ($P < 0,05$).

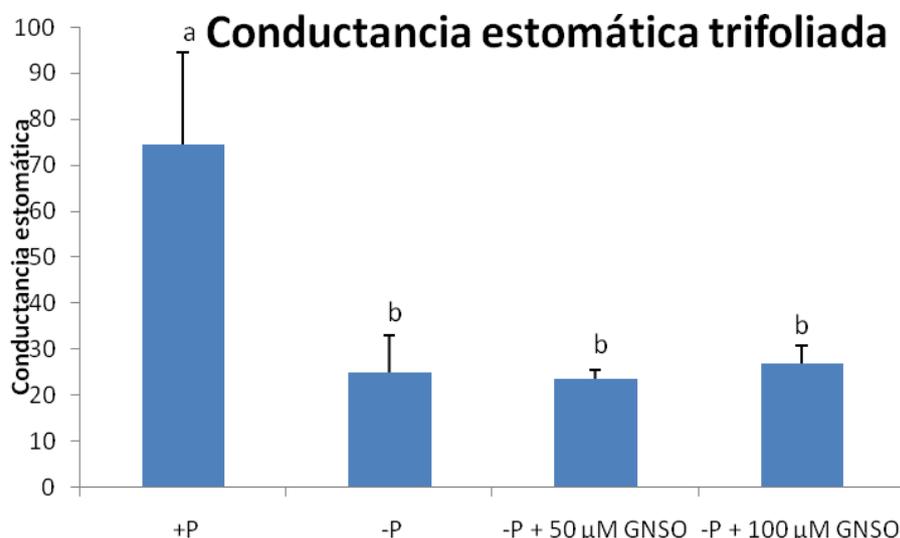


Figura n°10. Conductancia estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de la primera hoja trifoliada en la cara abaxial en plantas de soja (*Glycine max*) de 4 semanas de crecimiento.

Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa (+P) y sin el agregado de P (-P) y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes $50 \mu\text{M}$ (-P + $50 \mu\text{M}$ GNSO) y $100 \mu\text{M}$ (-P + $100 \mu\text{M}$ GNSO). Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey ($P < 0,05$).

Discusión:

La baja disponibilidad de P es uno de los principales factores que limitan la producción de cultivos en la mayor parte del planeta (Lynch y Deikman, 1998). Se han evidenciado diversas respuestas fisiológicas a la baja disponibilidad externa de P, algunas de las cuales varían en gran medida entre especies. Una de las respuestas típicas a un bajo nivel de P en el medio son los cambios en la arquitectura y la producción de biomasa radical (Henry y col., 2010). En mi trabajo se observó una disminución del peso fresco estadísticamente significativa en las plantas con tratamientos con restricción de P (Fig. 1). De manera contrastante, cuando se determinó peso fresco en raíces, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Fig. 2). Estos resultados concuerdan con la reducción del crecimiento del vástago observada en restricción de P en otros trabajos (Mollier y Pellerin, 1999; Tewari y col., 2004). Además, se ha observado que el área foliar se reduce significativamente con la falta de fósforo en *Phaseolus vulgaris* (Olivera y col., 2004). Este efecto podría estar parcialmente regulado por la vía de giberelinas-proteínas DELLA (Tewari y col., 2004). La limitación de P induciría la acumulación de proteínas DELLA como consecuencia de la reducción de los niveles de giberelinas activas. Esta reducción resultaría de una disminución de la transcripción de las enzimas que participan en la biosíntesis de giberelinas y de un incremento en los niveles de enzimas que participan en el metabolismo de las mismas (Jiang y col., 2007). Hasta el momento estas hipótesis no han sido analizadas en soja.

Una estrategia de las plantas frente a la deficiencia de P es modificar la disponibilidad de P en el suelo, a través de incrementos en la excreción de fosfatasas y ácidos orgánicos hacia la rizosfera para aumentar así la solubilidad del P presente en complejos insolubles en el medio. Además la arquitectura de la raíz puede verse modificada, aumentando la superficie de absorción. En *Arabidopsis thaliana*, la sola exposición del ápice de la raíz a la deficiencia de P en el medio induce una reducción del crecimiento de las raíces primarias y un aumento del crecimiento de las raíces laterales, tanto en número como en longitud (Svistonoff y col., 2007). En el presente trabajo de tesis no realicé un análisis de la arquitectura de la raíz, teniendo en cuenta que el sistema consistió en la utilización de cultivos hidropónicos en los cuales la raíz no tiene el mismo comportamiento que en el suelo, ya que está enfrentada a un medio espacialmente homogéneo en cuanto a su composición. En estas condiciones

experimentales se observaron alteraciones en la relación vástago/raíz frente a la deficiencia de P que indican una prioridad en el crecimiento de la raíz.

Trabajos previos (Lozano-Juste y León, 2011) demostraron que la adición de NO exógeno en plantas de *Arabidopsis* producía un menor crecimiento del hipocotilo, sin embargo en nuestro trabajo no observamos efectos significativos sobre el crecimiento de las plantas de soja. Se debe tener en cuenta que en nuestro caso, a diferencia de la publicación mencionada, las plantas estaban expuestas simultáneamente al dador de NO y a la condición de restricción de P.

Con respecto al contenido de P y la eficiencia de removilización del mismo desde las hojas más antiguas hacia las nuevas, en los resultados obtenidos no se observaron diferencias estadísticamente significativas pero hay una tendencia a ser mayor en todos los tratamientos con restricción de fósforo. Estos datos coinciden con lo indicado por la bibliografía para el P, el cual se considera un nutriente móvil en la planta.

Cuando se evaluaron los niveles de NO en muestras frescas cosechadas luego de cuatro semanas de crecimiento no se observaron diferencias significativas, como sí habían sido descritas en el caso de deficiencia de Fe en tomate (Graziano y Lamattina, 2007) y de P en lupino (Wang y col., 2010).

Una posible explicación para la discrepancia entre los resultados obtenidos y la bibliografía puede estar dada porque la producción de NO en los tejidos vegetales no es constante, varía con factores como la edad de las plantas y tiempos de tratamientos (Galatro y col., 2013). En este trabajo se realizó una única medición final luego de tres semanas de imposición de restricción de P. Resultaría interesante para futuros trabajos realizar un seguimiento a lo largo del tiempo de restricción de P, principalmente incluyendo eventos tempranos. Las raíces de plantas que estuvieron en contacto con el dador de NO (GSNO) no exhibieron niveles de NO, detectados con DAF-FM DA, apreciablemente diferentes en relación con las plantas no expuestas. En este sentido se debe tener en cuenta que una solución de GSNO 100 μM (utilizadas en estos experimentos) se traduce en una concentración máxima de NO de 0,6 μM a las 6 horas (medido en las mismas condiciones de este experimento (Buet y col., 2014). Una vez que el NO difunde dentro de los tejidos vegetales interactúa con las moléculas blanco (Simontacchi y col., 2013).

A partir de numerosas investigaciones, se le ha asignado un rol antioxidante al NO en plantas sometidas a diferentes tipos de estrés y en diversos procesos fisiológicos. Por ejemplo se ha demostrado un efecto protector del NO sobre la clorofila puesto que se observó una reducción de la pérdida de clorofila, debida a la exposición a un dador de NO, en hojas de poroto (*Phaseolus vulgaris*) irradiadas con luz ultravioleta (Shi y col., 2005). En este caso, el NO o los productos del dador de NO, podrían estar actuando como antioxidantes protegiendo los cloroplastos contra el daño foto-oxidativo desencadenado por la radiación de la luz ultravioleta (Foyer y col., 1994). En mi trabajo de tesis, se pudo evidenciar el efecto protector del NO al conservar los pigmentos fotosintéticos. La exposición a NO de las plantas cultivadas con restricción de P presentó valores de clorofila total similares al tratamiento control (Figs. 5a y 6a). Recientemente, se ha descrito que plantas mutantes de *Arabidopsis* con niveles reducidos de NO exhiben una aceleración de la senescencia debido a una pérdida de la inhibición, dependiente de NO, de la actividad de enzimas que participan en la degradación de clorofila (Liu y Guo., 2013). Además, esta relación del NO con el retraso de la senescencia se puede deber en parte a la regulación negativa de enzimas de la vía de síntesis de etileno (Procházková y Willhelmová, 2011).

En cuanto al contenido de carotenos en la hoja 1, el mismo no resultó afectado durante la restricción de fósforo (Fig. 5d). Sin embargo en la hoja trifoliada analizada se observa un aumento significativo de carotenos totales en los tratamientos con restricción de P en presencia del dador de NO comparado con los tratamientos –P sin dador de NO. Esta observación podría estar relacionada con el efecto del NO sobre el retraso de la senescencia comentado anteriormente.

Cuando se evaluó el rendimiento cuántico del fotosistema II en la hoja 1, se observó que los tratamientos – P con NO exógeno presentaron valores de rendimiento cuántico del fotosistema II similares al tratamiento control (Fig.7), sugiriendo una protección del NO sobre el aparato fotosintético. En cambio, en las hojas trifoliadas la disminución en el rendimiento cuántico del fotosistema II no se recuperó debido a la presencia de NO (Fig.14). En la literatura existen datos contradictorios en cuanto al efecto del NO sobre el funcionamiento del aparato fotosintético, debido principalmente a que los experimentos fueron realizados *in vitro*, empleando diferentes dadores de NO y dosis. Se ha demostrado en arveja (*Pisum sativum*) que el NO afecta la cadena transportadora de electrones del cloroplasto, constituyendo un sitio de acción del fotosistema II (PSII) (Wodala y col., 2008). El NO es capaz de unirse al Fe no hemínico que forma parte del complejo PSII (Petrouleas y Diner, 1990). Esta unión del NO con

el átomo de Fe impide el pasaje de electrones entre el dador y el receptor de los mismos, afectado la cadena transportadora de electrones del cloroplasto. El efecto protector del NO sobre el rendimiento cuántico del PSII puede estar, en nuestro modelo experimental, directamente relacionado con la protección sobre los pigmentos fotosintéticos y con la acción antioxidante en general.

Conclusión

Como conclusión general de este trabajo surge que si bien no se pudo comprobar un nivel diferencial de NO endógeno frente a la deficiencia de P en plantas de soja (se rechaza la primera hipótesis enunciada sobre los niveles diferenciales de NO), el agregado de NO en forma exógena previno la senescencia inducida por la deficiencia de P en las hojas más antiguas, manteniendo clorofila y funcionalidad del PSII (se verificó la segunda hipótesis en relación al NO y la senescencia). Resulta interesante que los efectos observados como consecuencia del agregado de NO fueron observados en las hojas sugiriendo un transporte de esta molécula bioactiva, o de otra señal originada por su presencia, desde la raíz, donde fue aplicada la solución, a la hoja.

Bibliografía

Bariola, P. A., Howard, C. J., Taylor, C. B., Verburg, M. T., Jaglan, V. D., & Green, P. J. (1994). The Arabidopsis ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *The Plant Journal*, 6(5), 673-685.

Bariola P., MacIntosh G.C., Green P.J. (1999) Regulation of S-Like ribonuclease levels in Arabidopsis. Antisense inhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation. *Plant Physiol.* 119:331-342.

Buet A., Moriconi JI., Santa-María G.E., Simontacchi M. (2014) Exposure to nitric oxide increases the nitrosyl-iron complexes content in sorghum embryonic axes. *Plant Physiology and Biochemistry* (2014) 83: 337-345.

Chen, J., Xiong, D.-Y., Wang, W.-H., Hu, W.-J., Simon, M., Xiao, Q., Chen, J., Liu, T.W., Liu, X., Zheng, H.-L. (2013). Nitric oxide mediates root K⁺/Na⁺ balance in a mangrove plant, *Kandelia obovata*, by enhancing the expression of AKT1-type K⁺ channel and Na⁺/H⁺ antiporter under high salinity. *PLoS One*, 8, e71543. doi:10.1371/journal.pone.0071543.

Chiou T.J., Lin S.I. (2011) Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Ann Rev Plant Biol* 62:185–206.

Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global environmental change*, 19(2), 292-305.

Correa-Aragunde, N., Graziano, M. and Lamattina, L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218, 900–905.

Epstein E., Bloom A.J. (2005) *Mineral Nutrition of Plants*. Second Edition. SinauerAssoc, Inc Publishers.

Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.J (1994) Photooxidante stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92 : 696-717.

Galatro A., Guiamet J.J., Puntarulo S., Simontacchi M. (2013) Chloroplast functionality has a positive effect on nitric oxide level in soybean cotyledons. *Plant Physiology and Biochemistry* 66: 26-33.

Gouvêa, J.F. Souza, A.C.N. Magalhães, I.S. Martins. (1997) NO releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *C.M.C.P Plant Growth Regulation* 21: 183-187.

Graziano M., Beligni, M V., Lamattina, L (2002) Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiol.* 4: 1852-1859.

Graziano M., Lamattina L (2007) Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. *The Plant Journal* 52:949-960.

Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T., (2011) On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci.* 16: 160-168.

Hao G., Du X., Zhao F., Shi R., Wang J. (2009) Role of nitric oxide in UV-B-induced activation of PAL and stimulation of flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba* callus. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* 2: 175-185.

Henry, A., N.F. Chaves, P.J.A. Kleinman y J.P. Lynch (2010). Will nutrient-efficient genotypes mine the soil? Effects of genetic differences in root architecture in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on soil phosphorus depletion in a low-input agroecosystem in Central America. *Field Crops Research* 115: 67-78.

Jasid S., Galatro A., Villordo J.J., Puntarulo S., Simontacchi M. (2009) Role of nitric oxide in soybean cotyledon senescence. *Plant Science*, 176: 662-668.

Jiang C., Gao X., Liao L, Harberd N.P, Fu X. (2007) Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the Gibberellin-DELLA signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 145: 1460-1470.

Jin C.W., Du S.T., Shamsi I.H., Luo B.F., Lin X.Y. (2011) NO synthase-generated NO acts downstream of auxin in regulating Fe-deficiency-induced root branching that

enhances Fe-deficiency tolerance in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 62: 3875-3884.

Kitajima, K. and Hogan, K. P. (2003), Increases of chlorophyll *a/b* ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant, Cell & Environment*, 26: 857–865.

Kitson RE, Mellon MG. (1944) Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanadophosphoric acid. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* 16: 379-383.

Lamattina L., García Mata C.,Graziano M., Pagnussat G. (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual review of Plant Biology* 54: 109-136.

Lambers, H., Finnegan, P. M., Laliberté, E., Pearse, S. J., Ryan, M. H., Shane, M. W., Veneklaas, E. J. (2011) Update on phosphorus nutrition in Proteaceae. Phosphorus nutrition of proteaceae in severely phosphorus-impooverished soils: are there lessons to be learned for future crops? *Plant Physiology* 156, 1058–66.

Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes *Methods in Enzymology* 148: 350-382.

Liu F., Guo F.-Q. (2013) Nitric oxide deficiency accelerates chlorophyll breakdown and stability loss of thylakoid membranes during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 8:e56345.

Lozano-Juste J., León J. (2011) Nitric oxide regulates DELLA content and PIF expression to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156:1410-1423.

Lynch, J.P. y J. Deikman (1998). Phosphorus in plant biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes. *Current Topics in Plant Physiology*. American Society of Plant Physiologists, Vol. 19. Rockville, MD, USA.

Maxwell K., Johnson N. (2000). Chlorophyll fluorescence. *Journal of Experimental Botany*. 51: 659-668.

Meng, Z. Bin, Chen, L. Q., Suo, D., Li, G. X., Tang, C. X., Zheng, S. J. (2012). Nitric oxide is the shared signalling molecule in phosphorus- and iron-deficiency- induced formation of cluster roots in white lupin (*Lupinus albus*). *Annals of Botany* 109, 1055–64.

Mollier A., Pellierin S. (1999). Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. *Journal of Experimental Botany* 50:487-497.

Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hancock J.T. (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiology*. 128:13–16.

Niu, Y. F., Chai, R. S., Jin, G. L., Wang, H., Tang, C. X., and Zhang, Y. S. (2013). Responses of root architecture development to low phosphorus availability: a review. *Annals of Botany* 112, 391–408.

Olivera, M., N. Tejera, C. Iribarne, A. Ocaña y C . Lluch (2004). Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Effect of phosphorus. *Physiologia Plantarum* 121: 498–505.

Pagnussat G.C., Simontacchi M., Puntarulo S., Lamattina L. (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology*. 129:954-956.

Petrouleas V., Diner B.A (1990) Formation by NO of nitrosyl adducts of redox components of the Photosystem II reaction center. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics* 1015:131-140.

Procházková D., Wilhelmová N. (2011) Nitric Oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence. *Nitric Oxide* 24: 61-65.

Shi S., Wang G., Wang Y., Zhang L. (2005) Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. *Nitric Oxide* 13:1-9.

Simontacchi M., Garcia-Mata C., Bartoli C.G., Santa-Maria G.E., Lamattina L. (2013) Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. *Plant Cell Reports*, 32 (6): 853-866.

Simontacchi M., Galatro A., Ramos Artuso F., Santa María G. E. (2015) Plant survival in a changing environment: nitric oxide as a cue to cope with abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, Vol 6, art. 977

Svistoonoff S., Creff A., Reymond M., Sigoillot-Claude C., Ricaud L, Blanchet A., Nussaume L., Desnos T. (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature genetics* 39; 792-796.

Tewari R. K., Kumar P., Tewari N., Srivastava S., Sharma P.N. (2004) Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses- influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. *Plant Science* 166: 687-694.

Terrile MC, París R, Calderón-Villalobos LI, Iglesias MJ, Lamattina L, Estelle M, Casalengué CA (2012) Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the Arabidopsis TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. *The Plant Journal* 70: 492-500.

Uexküll H.R.,Mutert E.W. (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil* 171: 1–15.

Wang B.L., Tang X.Y., Cheng L.Y., Zhang A.Z, Zhang W.H., Zhang F.S, Liu J.Q., Cao Y., Alla D.L., Vance C.P., Shen J.B. (2010) Nitric oxide is involved in phosphorus deficiency-induced cluster-root development and citrate exudation in whit lupin. *New Phytologist* 187:1112-1123.

Wang B.L. Sun J., Mao J. y col. (2013) A phosphate starvation response regulator Ta-PHR1 is involved in phosphate signalling and increases grain yield in wheat. *Annals of Botany* 111: 1139–1153.

Wodala B., Deák Z., Vass I., Erdei L., Altorjay I., Horváth F. (2008) In vivo target sites of nitric oxide in photosynthetic electron transport as studied by chlorophyll fluorescence in pea leaves. *Plant Physiology* 146: 1920-1927.

Xu J., Yin H., Li Y., Liu X. (2010). Nitric oxide is associated with long-term Zinc tolerance in *Solanum nigrum*. *Plant Physiology* 154:1319-1334.

Zhang M., Dong J-F., Jin H-H., Sun L-N., Xu M-J. (2011) Ultraviolet-B-induced flavonoid accumulation in *Betula pendula* leaves is dependent upon nitrate reductase-mediated nitric oxide signaling. *Plant Physiology* 31: 798-807.